UNTERSUCHUNGEN ZUR UROKINASE-HEMMUNG DURCH PROTEIN-INHIBITOREN TRYPSINÄHNLICHER PROTEINASEN UND DURCH AORTENEXTRAKT DES MENSCHEN

Bernhard Hugo

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546806_0004

Aus der Abteilung für
Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der
Chirurgischen Klinik Innenstadt der
Universität München
Leiter: Professor H. Fritz

UNTERSUCHUNGEN ZUR UROKINASE-HEMMUNG DURCH PROTEIN-INHIBITOREN TRYPSINÄHNLICHER PROTEINASEN UND DURCH AORTENEXTRAKT DES MENSCHEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bernhard Hugo
aus
München

1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz

Mitberichterstatter: ----------

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5. 5. 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	2
2.	Urokinase	4
2.1.	Plasminogenaktivierung durch Urokinase	5
2.2.	Biochemie	7
2.3.	Bestimmungsmethodik	7
3.	Experimenteller Teil	8
3.1.	Verwendete Lösungen	8
3.2.	Vorgehen bei der Messung	10
3.3.	Konzentrationsbestimmung der Inhibitoren	11
4.	Inhibitoren ohne Urokinase-Hemmeffekt	13
5.	Urokinase-Hemmung durch Trasylol, Antipain und Leupeptin	16
6.	Urokinase-Hemmung durch Seeanemonen-Inhibitor	21
7.	Urokinase-Hemmversuch mit Aortenextrakt des Menschen	23
8.	Diskussion	25
9.	Literatur	26
10.	Lebenslauf	30

1. EINLEITUNG

Viele Prozesse im Organismus werden durch Proteinasen katalysiert, u.a. auch Blutgerinnung und Fibrinolyse. Die Aktivität dieser Proteinasen wird üblicherweise durch im Organismus vorhandene Inhibitoren zeitlich und räumlich begrenzt. Für die trypsinähnlichen Proteinasen der Blutgerinnung und Fibrinolyse existieren starke Hemmstoffe, z.B. der Thrombininhibitor Antithrombin III bzw. der α_2 - Plasmininhibitor.

Auch im extravaskulären Raum wird die Fibrinolyse durch Proteinasen, so z.B. durch Gewebsaktivatoren, beschleunigt, indem diese die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin katalysieren. Diese Plasminogenaktivatoren sind in den meisten Geweben enthalten (34). Ihre Aktivität wird ebenfalls durch Inhibitoren begrenzt. Allerdings wurden im menschlichen Organismus bislang nur Inhibitoren mit geringer Hemmwirkung gefunden (34). Den Hemmstoffen der Gewebs-Plasminogenaktivatoren kommt Bedeutung für die Klinik zu, da die Plasminogenaktivatoren (z.B. Urokinase) therapeutisch eingesetzt werden.

Die physiologische Aufgabe dieser zellständigen Plasminogenaktivatoren liegt sehr wahrscheinlich in der Regulierung von Gewebsreparatur und in der Wundheilung durch Lyse extravaskulären Fibrins (39).

Die Plasminaktivatoren des Blutes stammen aus Endothelzellen kleiner Venen und möglicherweise auch anderer Blutgefäße (34). Ihre Aufgabe ist die Regulierung des physiologischen Spiegels der fibrinolytischen Aktivität im Blutkreislauf (34). Bei einem Defekt im Freisetzungs-

mechanismus dieser Aktivatoren könnte es theoretisch zu Thrombosierungen kommen (34). Als Stimuli zur Freisetzung sind Anoxie, elektrischer Schock, systemische Verabreichung vasoaktiver Substanzen wie Epinephrin, Acetylcholin, Serotonin, Histamin usf. bekannt (34).

In dieser Arbeit sollen isolierte Protein-Proteinase-Inhibitoren mit starker Hemmwirkung für trypsinähnliche Enzyme auf ihre Urokinase-Hemmeigenschaften geprüft werden. Des weiteren soll in verschiedenen Extrakten nach Urokinase-Inhibitoren gesucht werden.

Starke Urokinase-Hemmstoffe wären in verschiedener Hinsicht von Interesse: Sie könnten als Antidot die Blutungsgefahr bei der thrombolytischen Therapie mit Urokinase mindern. Außerdem könnte durch ihren Einsatz die Rolle der Urokinase bei hyperfibrinolytischen Blutungen untersucht werden; evtl. wären solche Hemmstoffe auch therapeutisch nutzbar. Schließlich wären solche Inhibitoren für die Aufklärung von Struktur und Funktion des aktiven Zentrums der Urokinase von Bedeutung.

2. UROKINASE

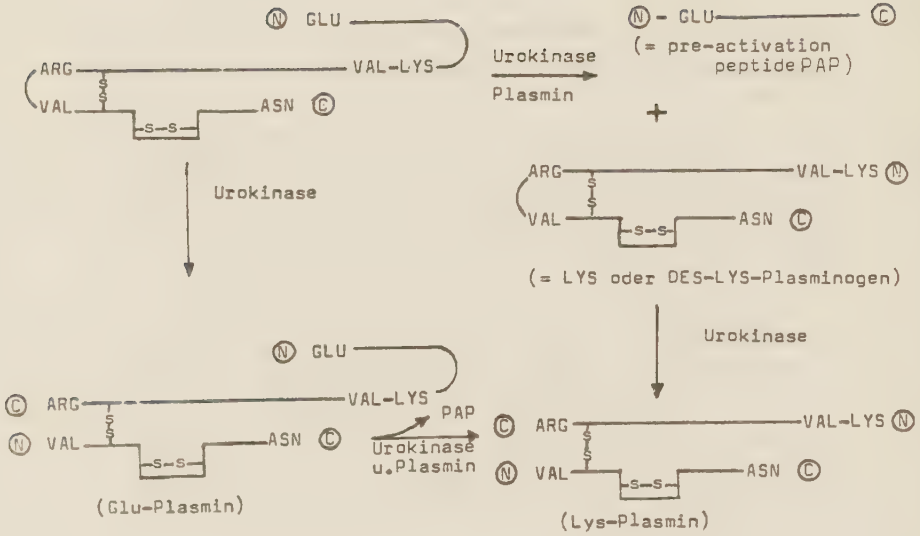
Im Urin sind eine Reihe von Proteinasen enthalten, jedoch konnte die fibrinolytische Aktivität von unspezifischer Proteolyse unterschieden und einem Plasminogenaktivator zugeordnet werden (39). Dieser Aktivator wurde Urokinase genannt.

Die frühere Vermutung, daß Urokinase mit dem aus Gefäßendothelien stammenden Plasma-Plasminogenaktivator identisch ist, konnte nicht bestätigt werden, nachdem Urokinase vom Plasma-Plasminogenaktivator immunologisch differenziert werden konnte (33). Nachdem es bislang nur mit embryonalen Nierenzellkulturen gelungen war, einen mit Urokinase immunologisch identischen Plasminogenaktivator zu produzieren (33), muß die Niere als einziger Syntheseort und die Urokinase als Gewebs-Plasminogenaktivator der Niere angesehen werden. Der Ausscheidungsmechanismus ist noch unklar. Da Urokinase im Blut nicht nachgewiesen wurde, liegt eine direkte aktive Ausscheidung von der Niere in den Urin nahe. Der Nachweis eines spezifisch gegen Urokinase gerichteten Inhibitors im Blut, dessen Konzentration von physiologischen und pathologischen Bedingungen abhängt (33), läßt andererseits vermuten, daß Urokinase zumindest teilweise indirekt, nach Übertritt in den Blutkreislauf, eliminiert wird. Somit könnte Urokinase eine Rolle in der Gefäßhomöostase spielen, obgleich der Nachweis einer systemisch pathophysiologischen Fibrinolyse durch Urokinase renalen Ursprungs noch nicht erbracht werden konnte (33). Wichtiger dürfte die Bedeutung der Urokinase bei lokalen fibrinolytischen Blutungen des Harntraktes sein.

Eine therapeutische Fibrinolyse mit Urokinase ist indiziert bei Thrombosierungen von Shunts und Bypass, bei schwerer Embolie mit Rechtsherz-überlastung, bei thrombotischen oder embolischen Arterienverschlüssen der Extremitäten und bei tiefen Beinvenenthrombosen. Bei jedem dieser Anwendungsgebiete ist die Indikation von Ausmaß, Lokalisation und dem Alter des Verschlusses abhängig. Eine Kontraindikation der Anwendung von Urokinase ergibt sich bei allen Zuständen von Blutungsneigung. Die gefährlichste Nebenwirkung liegt, sofern Urokinase nicht in einem Extrakorporalkreislauf angewendet werden kann, in der Entstehung fibrinolytischer Blutungen. Ein in vivo einsetzbares Urokinase-Antidot, das eine ähnliche Hemmstärke wie die Inhibitoren trypsinähnlicher Enzyme aufweist, existiert nicht. In der Klinik kommt deshalb als Antidot Trasylol zum Einsatz (Hemmverhalten s. Kap. 5.).

2.1. Plasminogenaktivierung durch Urokinase

Urokinase aktiviert Plasminogen durch hydrolytische Spaltung einer Arg-Val-Peptidbindung am carboxyterminalen Ende. Die Frage einer obligatorischen Freisetzung eines "pre-activation peptide" aus N-Glu-Plasminogen vor der Aktivierung zu Plasmin ist noch nicht endgültig geklärt. Folgende Aktivierungsschritte werden diskutiert:



Obiges Schema zeigt die möglichen Reaktionsabläufe bei der Plasminogenaktivierung. Dabei ist noch nicht gesichert, ob die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin ausschließlich erst nach Abspaltung des sog. pre-activation-peptide (=PAP) erfolgen kann und damit nur Plasminogen mit aminoterminalem Lysinrest aktiviert wird oder auch eine direkte Aktivierung von Plasminogen mit aminoterminalem Glutaminsäurerest möglich ist.

2.2. Biochemie

Im Gegensatz zu vielen analogen Enzymsystemen wurde kein Proenzym für Urokinase gefunden. Urokinase wird offensichtlich in voll aktiver Form in den Urin ausgeschieden. Es existieren zwei Formen des Plasminogenaktivators Urokinase. Die Form mit dem niederen Molekulargewicht (33400) besteht aus einer Polypeptidkette. Die Form mit dem höheren Molekulargewicht (47000) besteht aus zwei Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und von denen die schwerere (MG = 33100) das aktive Zentrum enthält. Die zweikettige Form scheint ein Vorläufer der einkettigen zu sein. Die molaren Aktivitäten beider Formen sind fast gleich. Die Aminosäurenzusammensetzungen zeigen keine großen Unterschiede, und die Zahl der sauren und basischen Reste ist in beiden Formen fast gleich. Im aktiven Zentrum wurden Serin und Histidin gefunden, was Urokinase als klassische Serinprotease erscheinen läßt.

2.3. Bestimmungsmethodik

Bisher wurde die Aktivität der Urokinase in einem System mit Plasminogen und Fibrin bestimmt. Die Differenzierung, welches Enzym (Urokinase oder Plasmin) gehemmt wird, stieß bei dieser Methode auf Schwierigkeiten. Durch die Entwicklung chromogener Substrate mit großer Spezifität für Urokinase durch Kabi Diagnostica konnten diese Schwierigkeiten zum Großteil beseitigt werden.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Verwendete Lösungen

Für die Messungen wurden die Substrate S-2444 und S-2227 verwendet:

Glu-Gly-Arg-NH- -NO_2•HCl MG=498,9 (S-2444)

H-Glu-Gly-Arg-pNA•2HCl MG=553,5 (S-2227)

Anleitung von Kabi-Diagnostika:

25 mg des Substrates S-2444 werden in 16,7 ml sterilem Wasser gelöst. Diese 3 mM Lösung ist, falls vor Kontamination mit Mikroorganismen geschützt, für mindestens zwei Monate bei +2 bis +8°C stabil.

Von S-2227 werden 25 mg in 25 ml sterilem Wasser aufgelöst, was eine 1,8 mM Lösung ergibt. Für die Stabilität gilt das bei S-2444 erwähnte.

Urokinase von Serono

100 000 I.E. (1 I.E. entspricht 1 CTA-Einheit oder 0,75 Ploug-Einheiten) werden in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und bei ca. +5°C aufbewahrt. Für die Messungen wird diese Stammlösung mit Puffer (s.unten) 20-fach verdünnt, was eine Konzentration von 2 500 I.E./ml (= Lösung I) ergibt. Ein Teil dieser Lösung I wird mit 5 Teilen Puffer weiter verdünnt (= Lösung II).

Lösung I wird bei ca. -20°C aufbewahrt (Haltbarkeit ca. ein Monat), Lösung II bei ca. +15°C (mindestens ein Tag haltbar).

Puffer: 0,05 M Tris, 0,038 M NaCl, pH=8,8 (bei 25°C durch Zusatz einer entsprechenden Menge 1 M HCl einzustellen). Der Tris-Puffer ist bei +2 bis +8°C für zwei Monate haltbar.

Bei den ersten Messungen (zur Durchführung s. Seite 10) wies die Urokinaseaktivität teilweise erhebliche Schwankungen auf. Durch Zusätze von NaCl, EDTA und $CaCl_2$ zur Pufferlösung (NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, $CaCl_2$ 0,02 M) ließ sich keine Aktivitätssteigerung erreichen. Bei Zusatz von NaCl und $CaCl_2$ verringerte sich die Aktivität sogar, nach EDTA-Zusatz entsprach sie der bisher erreichten Höchstaktivität. Erst der Zusatz von Triton X-100, einem neutralen Detergens, zur Pufferlösung in einer Konzentration von 0,005 Gewichtsprozent ergab eine beträchtliche Aktivitätssteigerung (+50 %) und die Aktivitätsschwankungen traten nicht mehr auf. Durch größere Tritonkonzentrationen ließ sich keine weitere Aktivitätssteigerung mehr erreichen. Bei Senkung der Tritonkonzentration unter 0,002 Gewichtsprozent der Pufferlösung trat ein rascher Aktivitätsverlust auf. Für die weiteren Messungen wurde eine Tritonkonzentration von 0,01 Gewichtsprozent in der Pufferlösung gewählt.

Das in der Meßvorschrift von Kabi-Diagnostika aufgeführte Detergens Carbowax wurde nicht verwendet, da die Urokinase-Aktivität bei Triton-Zusatz um 90 % über derjenigen bei Carbowax-Zusatz unter sonst gleichen Versuchsbedingungen lag und eine dementsprechend größere Meßwert-Streuung bei Carbowax-Zusatz zu erwarten gewesen wäre.

3.2. Vorgehen bei der Messung

Reagentien	Volumen (in ml)	Schritte
Puffer (auf 37°C vorgewärmt) in Küvette	0,8 - x	(1)
+ Urokinaselösung-II (gekühlt ca. +5°C) - gut mischen - für 1 - 2 min bei 37°C inkubieren	0,1	(2)
+ Inhibitor - mischen - 15 min inkubieren	x	(3)
+ Substrat S-2444 ca. 0,5 min mischen und im Photometer (Küvettenhalter auf 37°C vorgewärmt) bei 405 nm messen. Aus der Extinktionsdifferenz/min läßt sich die Aktivität berechnen: U/ml = 0,952 x E/min	0,1	(4)

Bei Verwendung des Substrates S-2227 wird ebenso vorgegangen, nur werden gemäß der Vorschrift von Kabi-Diagnostica 0,05 M Tris-Puffer, pH 9,0, mit 0,01 % Triton und eine 1,8 mM Substratkonzentration (1 mg S-2227/ml) verwendet.

Inhibitor- bzw. Extraktlösungen werden nach Schritt 2 zugegeben, das Puffervolumen wird um das Volumen dieser Lösungen verringert.

Vor Beginn der Messungen sollte ein Hemmversuch mit steigenden Trasylolkonzentrationen durchgeführt werden, um eine evtl. Kontamination mit anderen Proteasen aufzudecken, sowie den störenden Einfluß anderer proteolytischer Aktivitäten zu

verringern. Urokinase wird bei der obigen Meßmethode erst bei einer Trasylolkonzentration von ca. 3 µg/ml gehemmt. Messungen mit Urokinase von Serono ergaben keine mit Trasylol hemmbare Aktivität anderer Proteasen.

3.3. Konzentrationsbestimmung der Inhibitoren

Methode:
Kristallines Trypsin vom Rind, gefriergetrocknet, stabilisiert, Batch 63; 4130 NF units/mg; Molekulargewicht 24 000.

Davon werden 4 mg in 50 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 2 N HCl wird die Lösung auf pH 3,0 eingestellt.

0,2 M TRA-Puffer; 0,02 M $CaCl_2$; pH 7,8.
Substrat: N-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-HCl, abgekürzt BAPA (Hersteller Merck), Molekulargewicht 435.

167 mg BAPA werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst, dies entspricht einer 3,84 mM Lösung.

Prinzip: Benzoyl-Arg-pNA $\xrightarrow{\text{Trypsin}}$ Benzoyl-Arg + pNA.

Das freiwerdende pNA kann bei 405 nm photometrisch bestimmt werden.

Durch die Bestimmung der molaren Aktivität des Trypsin mit Hilfe von p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat kann man die molare Konzentration des verwendeten Trypsin bestimmen. Folglich lassen sich die molaren Konzentrationen aller Inhibitoren messen, die Trypsin in einem definierten äquimolaren Verhältnis (1:1) hemmen.

Mit dieser Titrationsmethode wurde die Trypsinmolarität zu 93 pmol/4 µg eingewogenem Trypsin bestimmt.

Reagentien	Volumen (in ml)	Schritte
Puffer in Küvette (Puffer auf 25°C vorgewärmt)	0,75 - x	(1)
+ Trypsinlösung (ca.5°C), gut mischen und einige Minuten bei 25°C inkubieren	0,05	(2)
+ Inhibitorlösung - mischen - 15 min inkubieren	x	(3)
+ BAPA (25°C) - ca. 0,5 min mischen, Extinktionsänderung pro min bei 405 nm messen	0,20	(4)

4. INHIBITOREN OHNE UROKINASE-HEMMEFFEKT

In den beiden folgenden Tabellen sind Inhibitoren und deren Eigenschaften aufgezählt, die in den angegebenen Konzentrationen keinen Hemmeffekt auf Urokinase hatten.

Inhibitor	Inhibitor bzw. Extrakt	Durch den Inhibitor gehemmte Trypsinmenge			Zum Urokinasehemmtest eingesetzte Inhibitor bzw. Probenmenge (in Klammern ist der molare Überschuß des Inhibitors über die Urokinase angegeben)
		Inhib. µg	Trypsin pmol	Verhältnis µg /pmol	
I- 1	Limabohnen	1	50	1 : 50	2 µg (12x);34µg (212x)
I- 2	Kartoffelextrakt	1	15	1 : 15	6 µg (11x);1,9mg(3560x)
I- 3	Seminalplasma v.Schwein	0,8	40	1 : 50	3 µg (19x);150µg(940x)
I- 4	Serum (Mensch)				5 µl; 10 µl; 50 µl
I- 5	Samenblasen des Meerschweinchens (2 Fakt.)	3 2	25 20	1 : 8,3 1 : 10	480 µg (500x) 560 µg (700x)
I- 6	B_1 aus Blutegeln	0,7	40	1 :57,2	2 µg (14x);13µg (90x)
I- 7	A aus Blutegeln	1,2	60	1 :49,8	2,5µg (15x);13µg (80x)
I- 8	Sojabohnen (Kunitz)	0,4	20	1 : 50	2 µg (12x); 30µg(185x)
I- 9	Sojabohnen (Bowman-Birk)	1	30	1 : 30	3 µg (11x); 30µg(110x)
I-10	Chicpease	0,6	15	1 :25,1	4 µg (13x); 35µg(110x)
I-11	Blutegel-Rohextrakt	5	60	1 : 12	22 µg (33x); 220 µg (330x); 2,22 mg (3330x)
I-12	Turkey-Egg	1	20	1 : 20	4 µg (10x); 1,62 mg (4050x)
I-13	HUSI-I menschl.Seminalplasma	2	40	1 : 20	7 µg (18x); 35 µg(88x)
I-14	HUSI-I menschl.Seminalplasma	150	60	1 :0,42	150 µg(8x); 1,7mg(90x)
I-15	Gemisch aus Weinbergschnecke	0,4	30	1 : 75	0,8 µg (8x); 8 µg (80x); 50 µg (500x)
I-16	α_1-Antitrypsin +)	1	13,5	1 :13,5	480 µg (190x)
I-17	Krill aus Fisch	430	90	1 :0,18	120 µg (3x)
I-18	Eiweißdrüse der Weinbergschnecke	30	60	1 : 2	60 µg (15x); 400 µg (100x); 2 mg (500x)

Tab. 1: Inhibitoren ohne Urokinase-Hemmeffekt. Die Inkubation erfolgte jeweils 15 min bei 25°C und 37°C mit 0,3 µg Urokinase (= 8 pmol) im Ansatz, siehe 2.3.

+) Mit α_1-Antitrypsin wurde zusätzlich eine progressive Hemmung versucht: 490 µg α_1-Antitrypsin wurden 5 Std. mit 0,9 µg Urokinase bei 37°C inkubiert. Die Trypsinhemmung ist in Menge Inhibitor/gehemmte pmol Trypsin angegeben. (Ansatz siehe Kap. 3.).

Tab. 2: Hemmspektrum und Molekulargewichte der eingesetzten Inhibitoren

Inhibitor	Molekulargewicht bei	Hemmspektrum	Literatur Ref.
I- 1	9 000	Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Protease E	1 - 5
I- 2	24 000; 32 000; 10 000	Trypsin, Chymotrypsin, Akrosin (Mensch) Carboxypeptidase, Speichel- Urin- und Plasmakallikrein (Mensch), 2 Plasma-Kinin-Forming-Enzymes	6 - 15
I- 3	12 000	Trypsin, Plasmin, Akrosin	8, 16-18
I- 4	diverse	Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Plasma- und Pankreaskallikrein, Thrombin, C_1-Esterase, Elastase	19
I- 5	7 000	Trypsin, Plasmin, Akrosin (Mensch)	20
I- 6	4 800	Trypsin, Plasmin	21
I- 7	7 000	Trypsin, Plasmin	21
I- 8	22 000	Trypsin, α-Chymotrypsin, Elastase, Acrosin (Mensch), Protease E	2, 8, 22 - 23
I- 9	8 000	Trypsin, Akrosin, Plasmin, Serum-Kallikrein, Elastase	8, 24 - 33
I-10	9 000	Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Cathepsin S, Thrombin	34
I-11	diverse	Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Cathepsin, Thrombin, Plasmin, Subtilisin	35
I-12	45 000	Trypsin, Akrosin, Chymotrypsin	1, 8
I-13	12 000	Trypsin, α-Chymotrypsin, neutrale Proteasen aus Leukozyten	36
I-14	8 000	Trypsin, Akrosin	36
I-15	7 000	Trypsin, Pankreaskallikrein, Plasmin, Chymotrypsin	37
I-16	54 000	Trypsin, Chymotrypsin, Serumkallikrein (progressiv) Elastase, Protease E, Akrosin (Mensch)	2, 38 - 42
I-17	7 000	Trypsin, Akrosin	[illegible]
I-18	10 000	Trypsin, Plasmin	43 - 45

Tab. 2: Die Inhibitoren, die in den in Tab. 1 aufgeführten Mengen im verwendeten Testsystem zu keiner Urokinase-Hemmung führten, sind ausnahmslos starke Hemmstoffe trypsinähnlicher Proteinasen. Daraus läßt sich die Sonderstellung der Urokinase gegenüber diesen Proteinasen ersehen: Obwohl die Urokinase viele synthetische Trypsinsubstrate zu spalten vermag und deshalb als trypsinähnliche Proteinase klassifiziert ist, wird sie durch die meisten der bekannten natürlichen Trypsininhibitoren nicht gehemmt.

5. UROKINASE-HEMMUNG DURCH TRASYLOL, ANTIPAIN UND LEUPEPTIN

Trasylol wird in der Klinik als Urokinase-Antidot im Fall einer Überdosierung während einer Thrombolysebehandlung verwendet. Die Hemmwirkung wurde bislang nur semiquantitativ im Test mit Urokinase, Plasminogen und Fibrinplatten bestimmt.

Die mikrobiellen Peptide Leupeptin und Antipain hemmen alle Serinproteinasen mit trypsinähnlicher Spaltspezifität. Eine Urokinase-Hemmung war deshalb zu erwarten.

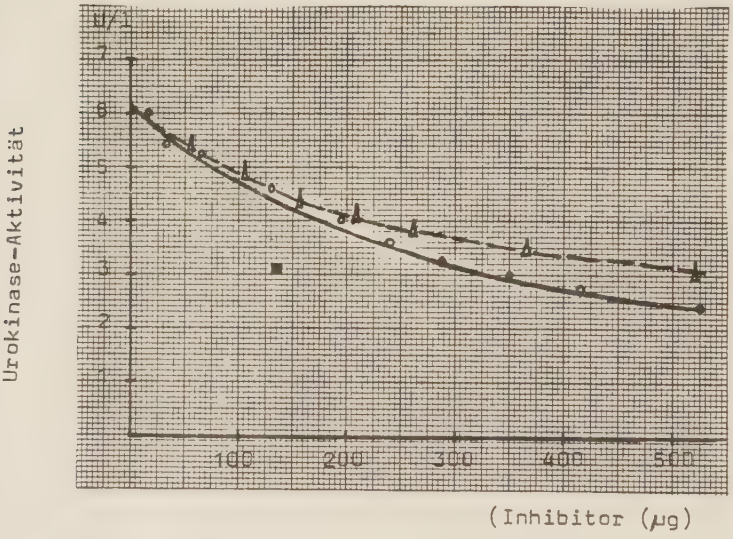


Abb. 1 Titrationskurven von Urokinase mit Trasylol und Antipain.
Expt. Bedingungen: o——o Trasylol
Δ---Δ Antipain
■ Leupeptin
Temperatur 37°, Inkubationszeit 10 min. Durchführung der Messung wie unter Kap. 3 beschrieben.

In Abb. 1 sind die mit Trasylol und Antipain erhaltenen Hemmkurven dargestellt.

Da von dem mikrobiellen Inhibitor Leupeptin nur eine kleinere Menge zur Verfügung stand, wurde hier nur die Konzentration bestimmt, bei der 50 % der Urokinase-Aktivität gehemmt wird, um einen Anhaltspunkt für die zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten einzusetzenden Mengen zu erhalten (Abb. 1). Die 50 %-Hemmung war bei 135 µg Leupeptin im 1 ml-Ansatz erreicht.

Zur Bestimmung der Dauer der Komplexbildung zwischen Urokinase und Inhibitor bis zur völligen Gleichgewichtseinstellung wurde eine größere Menge Enzym und Inhibitor in Pufferlösung inkubiert und nach 5, 10 und 15 min die Aktivität einer Probe mit dem Substrat bestimmt. Von dem jeweiligen Inhibitor wurde die Menge gewählt, die 50 % der Urokinase-Aktivität hemmt. Bei den mikrobiellen Inhibitoren Antipain und Leupeptin war das Gleichgewicht der Reaktion bereits nach 5 min erreicht. Beim Trasylolansatz war die Komplexbildung nach 10 min abgeschlossen.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Enzym-Inhibitor-Komplexe wurde die Methode nach Lineweaver-Burk (9) gewählt, bei der verschiedene Substratkonzentrationen zur Messung der restlichen Enzymaktivität bei gleichem Enzym-Inhibitor-Verhältnis im Ansatz verwendet werden.

Zur Auswertung werden die reziproken Werte der Aktivitäten und Substratkonzentrationen gegeneinander aufgetragen. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der Abszisse ergibt den negativ reziproken Wert der scheinbaren Michaeliskonstanten ($=K_{app}$). Die Michaeliskonstante selbst wird in gleicher Weise ohne Inhibitorzusatz bestimmt.

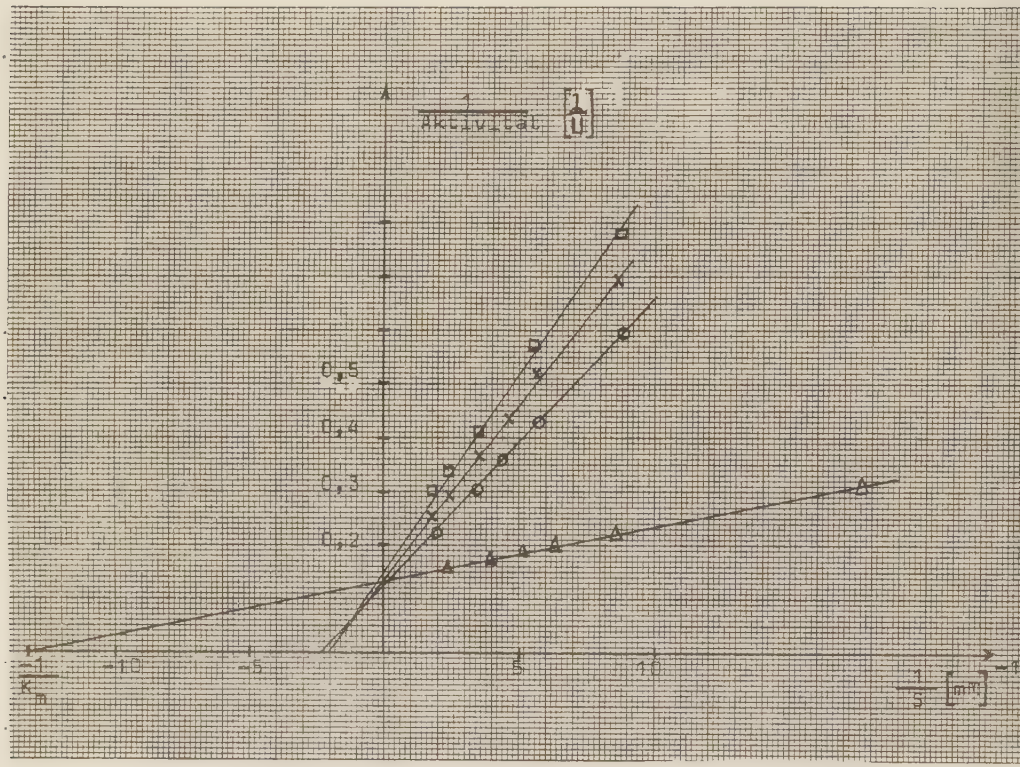


Abb. 2:
Lineweaver-Burk Diagramm zur Bestimmung der Michaeliskonstanten K_m (Δ—Δ) und der scheinbaren Michaeliskonstanten K_{app} von Urokinase bei Zusatz von Trasylol (O—O), Antipain (□—□) und Leupeptin (X—X). Experimentelle Bedingungen: Temperatur 37° C, Inkubationszeit 10 min. Im 1 ml-Ansatz waren jeweils enthalten: 8 pmol Urokinase, 0,18 µmol Substrat S-2444. Die Inhibitormengen betrugen: 44 pmol Trasylol, 416 pmol Leupeptin und 778 pmol Antipain.

Der Abb. 2 ist zu entnehmen, daß in Anwesenheit der Inhibitoren die Michaeliskonstante des Enzyms scheinbar vergrößert wird, die maximale Reaktionsgeschwindig-

keit (v_{max}) jedoch unverändert bleibt. Dies trifft nur dann zu, wenn eine kompetitive Hemmung vorliegt, bei der der Inhibitor in einer reversiblen Reaktion an der gleichen Stelle des Enzymmoleküls angreift wie das Substrat, und zwar am aktiven Zentrum. Unter dieser Voraussetzung kann aus der Michaelis-Menten-Beziehung folgende Gleichung abgeleitet werden:

$$v = \frac{v_{max} \times (S)}{K_m(1+(I))/ K_i + (S)} \qquad (G-1)$$

Den Wert von K_m erhält man aus dem Diagramm (Abb. 2):

$$-\frac{1}{K_m} = -13{,}3 \ mM^{-1}$$

oder

$$K_m = 0{,}075 \ mM = 7{,}5 \times 10^{-5} M; \qquad (G-1)$$

Entsprechend Gleichung G-1 ist K_{app} definiert als:

$$K_{app} = K_m (1 + (I) / K_i \qquad (G-2)$$

Umformen der Gleichung G-2 ergibt:

$$K_i = \frac{K_m \times (I)}{K_{app} - K_m} \qquad (G-3)$$

Für den Urokinase-Trasylol-Komplex ergibt sich:

$$-\frac{1}{K_{app}} = -2 \ mM^{-1};$$

$$K_{app} = 50 \times 10^{-5} M = 5 \times 10^{-4} M;$$

Aus der Trypsintitration (s. Kap. 4) mit Trasylol ergab sich, daß 0,85 µg Trasylol 4 µg Trypsin hemmen.

Durch NPGB-Titration von Trypsin wurde ermittelt, daß 4 µg Trypsin 93 pmol entsprechen.

Somit entsprechen 400 ug Trasylol im Ansatz mit Urokinase (Endvolumen 1 ml) einer Molarität von 44×10^{-6} M.

Einsetzen dieser Werte in Gleichung G-3 ergibt für den Urokinase-Trasylol-Komplex eine Dissoziationskonstante $K_i = 0{,}8 \times 10^{-5}$ M; (37°C).

Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, beträgt K_{app} für den Urokinase-Antipain-Komplex ebenfalls 50×10^{-5} M. Für die eingesetzte Antipainprobe wurde eine 100 % Reinheit angenommen. 480 µg entsprechen dann im Ansatz (1 ml) einer Molarität von 778×10^{-6} M.

Einsetzen dieser Werte in Gleichung G-3 ergibt für den Urokinase-Antipain-Komplex: $K_i = 14 \times 10^{-5}$ M; (37°C).

Für den Urokinase-Leupeptin-Komplex ist

$$K_{app} = 50 \times 10^{-5} \text{ M} \qquad \text{(Abb. 2).}$$

Eine Konzentration von 180 µg/ml im Ansatz entspricht bei angenommener 100 % Reinheit einer Molarität von 416×10^{-6} M.

Einsetzen dieser Werte in Gleichung G-3 ergibt für den Urokinase-Leupeptin-Komplex: $K_i = 7 \times 10^{-5}$ M; (37°C).

6. UROKINASEHEMMUNG DURCH SEEANEMONENINHIBITOREN

Bei dem Urokinase-Hemmversuch mit Seeanemonenrohextrakt ergab sich eine den Titrationskurven mit Trasylol und Antipain ähnliche Hemmkurve. Durch Titration des Seeanemonenrohextraktes mit Trypsin und durch Vergleich des Ergebnisses mit der Trypsin-Trasylol-Titration wurden die einander äquivalenten Mengen von Seeanemonenrohextrakt und Trasylol bestimmt. Aus dem Ergebnis läßt sich abschätzen, daß bei der Urokinasetitration mit Seeanemonenrohextrakt im Vergleich zur Urokinasetitration mit Trasylol die jeweils ca. siebenfachen Konzentrationen an Seeanemonenisoinhibitoren eingesetzt wurden, um eine ähnliche Hemmkurve zu erhalten. Dieses Ergebnis bedeutet, daß die Urokinasehemmung höchstwahrscheinlich durch den im Rohextrakt enthaltenen Seeanemoneninhibitor erfolgte, da dieser dem Trasylol strukturell sehr ähnlich gebaut ist und deshalb eine Urokinasehemmung bei dieser Inhibitor-Konzentration wahrscheinlich ist. Aus der Titrationskurve läßt sich abschätzen, daß der K_i-Wert des Seeanemoneninhibitor-Urokinase-Komplexes zwischen den K_i-Werten der Trasylol-Urokinase- und Antipain-Urokinase-Komplexe liegen muß. Eine Messung nach Lineweaver-Burk wurde nicht durchgeführt.

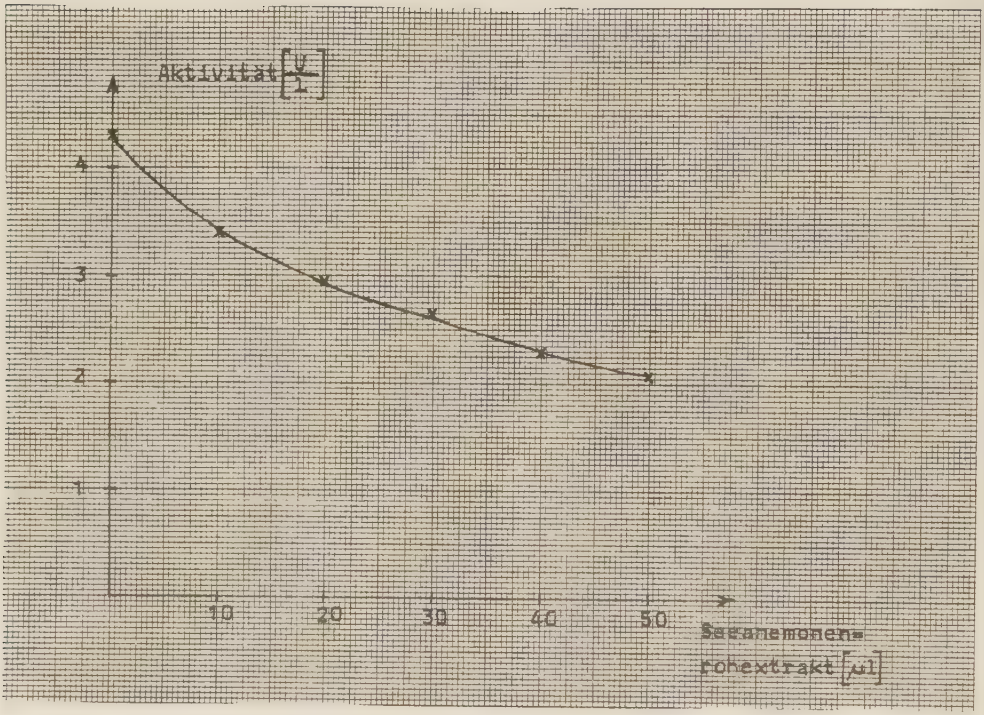


Abb. 3: Titrationskurve von Urokinase mit Seeanemonen-Isoinhibitoren. Expt. Bedingungen: Temperatur 37°C, Inkubationszeit 15 min.
Die Durchführung der Messung erfolgte wie unter Kap. 3 beschrieben.

7. UROKINASE-HEMMVERSUCH MIT MENSCHLICHEM AORTENEXTRAKT

Da die Wirkung eines Plasminogenaktivators in Gefäßwänden und Endothelzellen lokal besonders ausgeprägt ist, wurde die Aorten-Aneurysmawand eines 45-jährigen Patienten auf Urokinaseinhibition untersucht. Dieses Aneurysma erstreckte sich über Aorta ascendens und descendens des Patienten. Das Aneurysma bildete sich zwischen Intimaschicht und den übrigen äußeren Schichten (Media und Adventitia) der Aorta, so daß das untersuchte Gewebe aus den Media- und Adventitiaschichten bestand, die Intimaschicht und damit das Endothel konnten also nicht untersucht werden. Jedoch dürfte sich über der Media-Schicht eine neue Endothelschicht ausgebildet haben. Das Aneurysma wurde nach der operativen Entfernung in physiologischer Kochsalzlösung bei ca. +5°C aufbewahrt. Es wurde nach 2 bis 3 Tagen aufbereitet und am 3. Tag zum Hemmversuch mit Urokinase eingesetzt.

Aufbereitung:
Das Gewebe wurde sehr klein zerschnitten und 3,6 g davon in 7,2 ml physiologischer Kochsalzlösung 4 x je 20 sec mit Ultraschall bei Eiskühlung homogenisiert. Die groben Gewebsreste wurden entfernt und der Rest bei 20 000 rpm und 4°C 15 min zentrifugiert. Die Zentrifugation ergab einen klaren Überstand (Ü-1), der bei +5°C aufbewahrt wurde. Der Niederschlag wurde in 3 ml 1 M KCl-Lösung aufgenommen und nochmals 4 x je 20 sec mit Ultraschall bei Eiskühlung homogenisiert. Anschließendes Zentrifugieren (6000 rpm; 20°C; 1,5 min) ergab ebenfalls einen klaren Überstand (Ü-2).

Beim Hemmversuch mit Urokinase (0,5 ml Tris-Puffer, 0,1 ml Urokinase (Lösung II), 0,3 ml Ü-1 bzw. Ü-2, 0,1 ml S-2227 Lösung), der bei 25°C und 37°C jeweils 15 min lang durchgeführt wurde, waren die Aktivitäten gleich denen der Leerwerte (0,5 ml Tris-Puffer; 0,1 ml Urokinase; 0,3 ml 1 M KCl- bzw. physiol. NaCl-Lösung; 0,1 ml S-2227 Lösung).

Zuletzt wurde der noch nicht aufbereitete Rest des Gewebes (3,6 g) in 7,2 ml physiol. NaCl mit 0,05 % Triton-Zusatz bei Eiskühlung 4 x je 20 sec ultraschallhomogenisiert und nach Entfernung gröberer Gewebereste 15 min bei 4°C und 30 000 rpm ultrazentrifugiert. Dies ergab einen klaren Überstand.

Der Urokinase-Hemmversuch wurde in gleicher Weise wie mit den NaCl- und KCl-Extrakten durchgeführt. Im Hemmansatz resultierte gegenüber den beiden identischen Leerwerten (statt 0,3 ml Extrakt 0,3 ml physiologische NaCl/0,05 % Triton-Lösung) eine Aktivitätssteigerung um 15 %. Die zusätzliche Aktivität ließ sich durch Zusatz von Trasylol nicht hemmen. Es wurden dabei Trasylol-Konzentrationen bis zu der Höhe eingesetzt, bei der die Urokinasehemmung durch Trasylol beginnt.

Daraufhin wurde die Aktivität des Aortenextraktes für sich allein bestimmt (wobei im Ansatz das Puffervolumen um das fehlende Urokinasevolumen vermehrt wurde). Die resultierende Aktivität entsprach der Differenz zwischen der Aktivität des Urokinase-Aortenextrakt-Ansatzes und der Urokinase-Aktivität. Urokinase wurde demnach durch den Aortenextrakt nicht gehemmt.

8. DISKUSSION

Alle bekannten Inhibitoren für trypsinähnliche Enzyme hemmen Urokinase in den in der Tabelle aufgeführten Konzentrationen nicht, was die hohen Spezifitätsanforderungen der Urokinase zeigt. Andererseits bewirken Trasylol und der Seeanemoneninhibitor eine schwache kompetitive Hemmung der Urokinase. Aus diesem Hemmverhalten läßt sich schließen, daß der Angriffspunkt dieser Inhibitoren das aktive Zentrum des Urokinasemoleküls ist.

Trasylol hemmt Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin sowie Organ- und Gewebskallikreine. Der Molekülbereich, in dem die Bindung an das Enzym, insbesondere Trypsin, erfolgt, ist heute genau bekannt. Offensichtlich hat die Urokinase eine Molekülstruktur im aktiven Zentrum, die nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip zum reaktiven Bereich des Trasylolmoleküls paßt. Obwohl die Struktur der Urokinase noch nicht bekannt ist, kann man daraus folgern, daß die entsprechenden Sequenzbereiche all dieser Serinproteinasen ähnlich gebaut sein müssen, damit eine Konformation entsteht, die zur Komplementär-Konformation des Trasylol paßt. Das Hemmspektrum des Trasylols ist dementsprechend zu erweitern und erstreckt sich auf Urokinase, obgleich die Affinität zu dieser relativ gering ist, verglichen mit der zu den anderen genannten Proteinasen.

Die mikrobiellen Peptide Leupeptin und Antipain haben als wirksame Gruppe eine Aldehydfunktion am Argininrest sie hemmen deshalb grundsätzlich alle Serinproteinasen mit trypsinähnlicher Spaltspezifität. Die Hemmung der Urokinase durch Leupeptin und Antipain war deshalb zu erwarten.

9. LITERATUR

1. BALLS, A.K. and RYAN, C.A., J. Biol. Chem., 238 p. 2976 (1963).

2. BELITZ, H.D., KAISER, K.P. and SANTARIUS, K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, p. 420 (1971).

3. BIETH, J., AUBRY, M., TRAVIS, J. in 15, p. 56.

4. BIETH, J. and FRECHIN, J.-C. in 15. pp. 293 f.

5. BIRK, Y.: V. Biochem. Congr. Moskau 1961, p. 100.

6. BIRK, Y., Biochem. Biophys. Acta 54, pp. 278 f. (1961).

7. BIRK, Y. in 15., p. 356.

8. BIRK, Y. in Proceedings of the 2nd Intern. Res. Conf., Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors (Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and Truscheit, E., Hrsg.), p. 357; Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1974).

9. BUDECKE, E.: Grundriss der Biochemie, Walter de Gruyter Berlin - New York, S. 18 - 28, (1974).

10. FEINSTEIN, G., HOFFSTEIN, R. and SOKOLOVSKY, M. in 15. p.207 - 210.

11. FIGARELLA, C., NEGRI, G.A. and GUY, O. in 15. p. 217 - 220.

12. FINK, E., KLEIN, G., HAMMER, F., MÜLLER-BARDORF, G. and FRITZ, H. in 17. p. 232 - 235.

13. FRITZ, H., BREY, B., SCHMAL, A., WERLE, E.: Z. physiol. Chem. 350, p. 1551 (1969).

14. FRITZ, H., GEBHARDT, M., MEISTER, R. and FINK, E. in Proceedings of the Intern. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors, (Fritz, H., Tschesche, H., Hrsg.) pp. 271 - 280; Walter de Gruyter, Berlin - New York, 1971).

15. FRITZ, H., GREENE, L.J. and TRUSCHEIT, E., Hrsg. 1974: Proceedings of the 2nd Intern. Res. Conf., Bayer Symposium V, Proteinase Inhibitors; Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.

16. FRITZ, H., FINK, E., MEISTER, R. and KLEIN, G., Z. Phyiol. Chem. 351, S. 1344 - 1352 (1970).

17. FRITZ, H., TSCHESCHE, H., Hrsg., 1971: Proceedings of the Intern. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors, Munich, November 4-6, 1970; Walter de Gruyter, Berlin - New York.

18. GREEN, N.M. and NEURATH, H.: In: The Proteins, New York II B (1954), p. 1160.

19. HEIMBURGER, N. in Proceedings of the Intern. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors; Fritz, H., Tschesche, H. (Eds.); pp. 1 - 22; Verlag Walter de Gruyter, Berlin - New York, (1971).

20. HEIMBURGER, N., FRITZ, H., WUNDERER, G., KUMMER, K. and WERLE, E. (1972), Z. physiol. Chem. 353, 906 - 910.

21. HEIMBURGER, N., HAUPT, H. and SCHWICK, H.G. in Proceedings of the Intern. Res. Conf. on Proteinase Inhibitors, (Fritz, H., Tschesche, H., Hrsg.), pp. 12 - 13; Walter de Gruyter, Berlin - New York, (1971.

22. HOJIMA, Y., MORIWAKE, C. and MORIYA, H., J. Biochem., 73, p. 933 - 943 (1973).

23. HOJIMA, Y., MORIWAKI, C. and MORIYA, H. (1973) a. J. Biochem. 73, p. 923 - 932.

24. IWASAKI, T., KIYOHARA, T. and YOSHIKAWA, M., J. Biochem., 70, p. 817 (1971).

25. IWASAKI, T., KIYOHARA, T. and YOSHIKAWA, M.: J. Biochem. (Tokyo) 71, p. 335, (1973).

26. IWASAKI, T., KIYOHARA, T. and YOSHIKAWA, M.: J. Biochem. (Tokyo) 73, p. 1039 (1973).

27. JONEX, G., MOORE, S. and STEIN, W.H.: Biochemistry 2 (1963), p. 66.

28. KIYOHARA, T., IWASAKI, T. and YOSHIKAWA, M., Sci. Rept. Fac. Agr. Kobe Univ., 10, p. 115 (1971).

29. KUNITZ, M.: J. gen. Physiol. 30 (1947), p. 291

30. MALLORY, P.A., and TRAVIS, J. in 15. p 251.

31. MARKUS, A. and WERKHEISER, W.C.: Fed. Proc. 21, (1962), p. 64.

32. MAXWELL, R.E., LEWANDOWSKI, V. and NICKEL, V.S.: Life Sci. 4 (1965), p. 45.

33. OGSTON, D., BENNETT, B. (Eds.): Haemostasis: Biochemistry, Physiology and Patology; John Wiley & Sons, London, New York, Sidney, Toronto, p. 493, p. 223.

34. POLLER, L. (Ed.): Recent Advances in Blood Coagulation, Number Two, Churchill Livingston, Edinburgh, London and New York, pp. 100 - 111; (1977).

35. RYAN, C.A.A., HASS, G.M., KUHN, R.W. and NEURATH, H. in 15. p. 565.

36. SCHIESSLER, H., ARNHOLD, M. and FRITZ, H. in 15. pp. 147 - 155.

37. SCHIESSLER, H., SCHLEUNING, W.-D. and FRITZ, H. in Adr. Biosciences, X, pp. 271 - 286; (Raspé, G., Bernhard, S. (Eds.), Pergamon Press - Vieweg, Oxford - Braunschweig, (1973).

38. SEEMÜLLER, U., MEIER, M., OHLSSON, K., MÜLLER, H.-P. and FRITZ, H. 1977 in: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., pp. 1105 - 1117.

39. SOBEL, C.W., MOHLER, S.R., JONES, N.W., DOWDY, A.B.C. and GUEST, M.M., Am. J. Physiol. 171, p. 768 (1952).

40. STEINER, R.F.: Arch. Biochem. 49 (1954), p. 71.

41. TSCHESCHE, H., DIETL, T., MARX, R. and FRITZ, H. 1972. Z. Physiol. Chem. 353, 483 - 486.

42. TSCHESCHE, H., KUPFER, S., LENGEL, O., KLAUSER, R., MEIER, M. and FRITZ, H. in 15. p. 173.

43. WALFORD, R.L. and KICKHÖFEN, B.: Arch. Biochem. 98 (1962), S. 191.

44. WERLE, E. and MAIER, L.: Biochem. Z. 323 (1952), Seite 279.

45. ZANEVELD, L.J.D., POLAKOSKI, K.L., ROBERTSON, R.T. and WILLIAMS, W.L. in 17. p 239.

46. ZANEVELD, L.J.D., SCHUMACHER, G.F.B., TAUBER, P.F. and PROPPING, D. in 15. p 140.

Herrn Dr. T. Dietl bin ich für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. H. Fritz möchte ich für die Überlassung des Themas und für seine Anleitung bei der Durchführung der Arbeit sehr herzlich danken.

Den Mitarbeitern der Abteilung, die Inhibitoren für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben, möchte ich hiermit meinen Dank aussprechen.

10. LEBENSLAUF

Geboren am	19. Mai 1953
in	München
Eltern	Josef Emil Hugo, Kaufmann verstorben 1971 Marianne Hugo, geb. Schlatterer selbst. Kaufmann
Schulen	1959-1963 Volksschule in München 1963-1972 Dante-Gymnasium in München Zeugnis der Reife am 23.6.1972
Studium	1972-1974 Chemie/Physik für das Lehramt an der Ludwig-Maximilians-Universität München 1974-1980 Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München Approbation am 23. Mai 1980
Militärdienst	Seit August 1980 Stabsarzt